

**Zur Bestimmung von 5-Phosphoribosyl-1-pyrophosphat
und der 5-Phosphoribosyl-1-pyrophosphat-Synthese
in intakten Erythrocyten des Menschen**

Hanns Thiel

1974



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41551924_0091

Aus der Medizinischen Poliklinik der
Universität München
Direktor Prof. Dr. N. Zöllner

Zur Bestimmung von 5 - Phosphoribosyl - 1 - pyrophosphat
und der 5 - Phosphoribosyl - 1 - pyrophosphat - Synthese
in intakten Erythrocyten des Menschen

Inaugural - Dissertation

Zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfaßt und einer Hohen Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians - Universität zu München

vorgelegt von
Hanns Thiel
aus
Maisach

1974

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität
München

Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. W. Kaiser

Mitberichterstatter: Prof. Dr. N. Zöllner

Dekan: Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 16. Juli 1974



Inhaltsverzeichnis

I. Abkürzungen	Seite 1
II. Einleitung	2
III. Materialien und Methodik	5
IV. Eigene Untersuchungen	6
1. PRPP-Konzentration in Erythrocyten	
2. Messung der PRPP"generation"	
3. Optimale Testbedingungen	
4. Enzyme und Enzymkonzentrationen	
5. Spezifität	
6. Genauigkeit der Methode	
7. PRPP-Gehalt der Erythrocyten von gesunden Personen	
V. Diskussion	8
VI. Zusammenfassende Diskussion	12
VII. Zusammenfassung	14
VIII. Literaturübersicht	15
IX. Abbildungen	17

I. Abkürzungen

APRT-ase	Adenin-Phosphoribosyltransferase (EC.2.4.2.7.)
HGPRT-ase	Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase (EC.2.4.2.8.)
ODC-ase	Orotidin-5'-phosphat-Decarboxylase (EC.4.1.1.23)
OPRT-ase	Orotsäure-phosphoribosyltransferase (EC.2.4.2.10)
DPG	2,3-Diphosphoglycerat
EdTA	Athylendiamin-tetra-acetat
PRPP	5-Phospho-D-ribosyl-1-pyrophosphat
AMP	Adenosinmonophosphat
ADP	Adenosindiphosphat
ATP	Adosintriphosphat
CMP	Cytidinmonophosphat
CDP	Cytidindiphosphat
GDP	Guanosindiphosphat
IMP	Inosinmonophosphat
O-5'-MP	Orotidin-5'-monophosphat
U-5'-MP	Uridin-5'-monophosphat
UDP	Uridindiphosphat

II. Einleitung

Nach neueren Untersuchungen, vor allem von Fox und Kelly (1), spielt die intrazelluläre Konzentration von PRPP eine kritische Rolle in der Regulation des Purinstoffwechsels beim Menschen.

Der intrazelluläre Gehalt dieses Substrats wird bei bestimmten Krankheiten und durch verschiedene Medikamente signifikant gegenüber der Normalkonzentration verändert; dabei lassen sich gewisse Beziehungen zur Purinsynthese nachweisen.

PRPP ist ein Ribose-Zucker, der an der Position 5 mit Phosphat und an der Stellung 1 mit Pyrophosphat substituiert ist. Es wird aus Ribose-5-Phosphat und ATP in Gegenwart von Magnesium, anorganischem Phosphat und dem Enzym PRPP-Synthetase synthetisiert.

Die Stimulation der PRPP-Synthese durch Glukose, Fruktose und die Hemmung der Synthese durch Jodacetat und Dinitrophenol weisen auf die Bedeutung von glykolytischen Stoffwechselprodukten bei der Regulation der Verfügbarkeit von Ribose-5-phosphat und der PRPP-Synthese hin.

Sowohl in vivo-Untersuchungen als auch Studien an Fibroblasten deuten darauf hin, daß die intrazelluläre PRPP-Konzentration eine wichtige Rolle bei der Regulation der de novo-Purinbiosynthese spielt (2,3). Senkung der intrazellulären PRPP-Konzentration, z.B. infolge von Orotsäureverabreichung, führt sowohl in vivo als auch in Zellkulturen zu einer Verminderung der de novo-Purinsynthese (3). Erhöhungen der PRPP-Spiegel in Fibroblastenkulturen mit Methylenblau ergeben dagegen eine gesteigerte de novo-Purinsynthese (2). Medikamente, die die intrazelluläre PRPP-Konzentration ändern, können unter Umständen die Geschwindigkeit der Purinsynthese beeinflussen. Die beobachtete Senkung des intrazellulären PRPP-Gehaltes durch Allopurinol

(4) trägt so zu der verminderten de novo-Purinsynthese während der Behandlung mit bei.

Höhere intrazelluläre PRPP-Spiegel sollen Ursache für einige urikämische Zustände sein, die mit einer Überproduktion an Harnsäure einhergehen. Bei der primären Gicht konnten erhöhte PRPP-Spiegel der Patienten mit partiellem Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase-Defekt beobachtet werden. Verschiedene Untersuchungen weisen darauf hin, daß eine gesteigerte Fähigkeit zur PRPP-Synthese zur Gicht führen kann.

Die Synthese und die Weiterverwendung von PRPP gehen über verschiedene Stoffwechselwege, die bei Änderung eines Stoffwechselweges die intrazelluläre PRPP-Konzentration beeinflussen können.

PRPP wird im allgemeinen aus Glukose über die oxydativen oder nichtoxydativen Stoffwechselwege des Pentosephosphatweges synthetisiert. Die Faktoren, die die PRPP-Konzentration regulieren, sind in Abb. 1 dargestellt. Es darf vermutet werden, daß die Synthese dieses Substrats für die de novo-Purinsynthese - und damit die Geschwindigkeit der Synthese - von all jenen diätetischen und hormonalen Faktoren abhängig ist, die dafür bekannt sind, die Geschwindigkeit des glykolytischen und des Pentosephosphat-Stoffwechsels zu beeinflussen.

PRPP ist jedoch nicht nur ein Substrat für die PRPP-Amidotransferase und somit für den ersten, geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der de novo-Purinsynthese, sondern auch für die Enzyme der Purinreutilisation (HGPRT-ase und APRT-ase) sowie für den Pyrimidinaufbau (OPRT-ase).

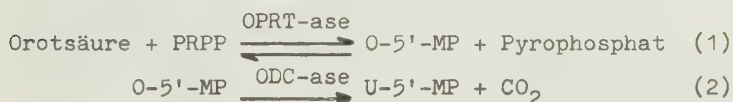
Die Synthese von PRPP (=PRPP"generation") in den Erythrocyten ist nach den Untersuchungen von Hershko et al. (9) streng limitiert durch kontrollierende Einflüsse bestimmter Metabolite auf die katalytischen Eigenschaften der PRPP-Synthetase. Als geschwindigkeitsbestimmende Fak-

toren für die PRPP-Synthese in intakten Erythrocyten gelten die Gehalte an anorganischem Phosphat, an Ribose-5-phosphat, in zellfreien Präparationen daneben vor allem ATP und ADP, sowie GDP und 2,3-DPG, in geringerem Ausmaß auch an anderen Nukleotiden wie AMP, UMP, UDP, CMP und CDP (9). Den Hauptanteil bei der Kontrolle dieses Systems scheint die Hemmung der PRPP-Synthetase durch ADP dazustellen. Diese Tatsache wurde von Atkinson und Fall (13) als Regulationsmechanismus für die Zelle gedeutet, damit überflüssige Verwendung von Energie bei der Bildung von PRPP und dessen Weiterverwendung bei der Biosynthese von Nukleotiden vermieden wird. Die Empfindlichkeit der PRPP-Synthetase auf ADP-Hemmung könnte ein Mittel darstellen um die PRPP-Synthese mit dem ATP/ADP-Verhältnis - welches als Maß für die Verfügbarkeit von metabolischer Energie gilt - zu koordinieren. Die allgemeine Empfindlichkeit der PRPP-Synthetase gegen die kompetitive Hemmung durch Nukleotide ist eventuell als eine Feedback-Kontrolle für die PRPP-Synthese durch den gesamten Pool der Nukleotidprodukte aufzufassen.

Bei der in vitro-Bestimmung des während einer gewissen Zeitdauer entstehenden PRPP im Hämolysat gewaschener Erythrocyten (PRPP-Synthese oder PRPP"generation") ergeben sich summarische Rückschlüsse auf die in vivo zum Zeitpunkt der Blutabnahme vorhandenen Einflüsse auf die PRPP-Synthetase, d.h. es wird nicht die maximale enzymatische Aktivität der PRPP-Synthetase gemessen, sondern die PRPP-Synthese unter dem Einfluß der aktuell vorhandenen PRPP-Synthetase-Konzentration und der gerade vorhandenen Effektor- und Inhibitorkonzentrationen auf die PRPP-Synthetase.

Um die Wirkung von z.B. Xylit- oder Fruktoseinfusionen auf die Erhöhung der de novo- Purinsynthese beim Menschen aufzuklären, schien es uns wichtig, sowohl den Gehalt an PRPP in den Erythrocyten - der geschwindigkeitsbestimmenden Substanz am ersten Schritt der de

novo-Purinbiosynthese - als auch eventuelle Veränderungen in der PRPP-Neusynthese zu bestimmen. Mit der hier ausgearbeiteten Methode sind diese Untersuchungen möglich. Die bisher üblichen Verfahren zur Bestimmung von PRPP in Erythrocyten (7,12) basierten im wesentlichen auf dem Prinzip der IMP-Bildung aus dem proteinfreien Überstand (in Gegenwart eines Überschusses von 8-¹⁴C-Hypoxanthin) mit Hilfe des Hämolysats (nach Behandlung mit Aktivkohle) als Quelle von HGPRT-ase. Eine enzymatische, spektrophotometrische Methode, bei der OPRT-ase zur Messung von Orotsäure verwendet wurde, beschrieben Lieberman et al. (5). Wir fanden dieses Prinzip theoretisch geeignet zur Messung von PRPP und zur Bestimmung der PRPP"generation". Die Reaktion läuft in folgender Weise ab:



Unter Verwendung dieses Prinzips konnten wir eine einfache, genaue und schnelle Methode zur Bestimmung des PRPP-Gehaltes in Erythrocyten und zur Messung der in vitro-PRPP"-generation im Hämolysat ausarbeiten.

III. Materialien und Methodik

Alle Reagenzien waren von höchster Reinheit und wurden in destilliertem Wasser gelöst. Die radioaktiven Substanzen wurden von New England Nuclear (Frankfurt) gekauft: Orotic-carboxyl-¹⁴C-acid-hydrate, spezifische Aktivität 10,2 mC/mM, Orotic-6-¹⁴C-acid, 30-50 mC/mM, PRPP-MgCl₂ (von Serva, Heidelberg) OPRT-ase und ODC-ase (aus Bierhefe) (von Boehringer, Mannheim).

IV. Ergebnisse

Enzymtest:

1. PRPP-Konzentration in den Erythrocyten

Den PRPP-Gehalt der Erythrocyten bestimmten wir im endgültigen Test auf folgende Weise:

Etwa 5 ml Blut wurden nach Mischen mit ca. 500 I.E. Heparin bei 3000 Umdrehungen/min. zentrifugiert und die Erythrocytensuspension bei 4° C zweimal mit 10 ml physiologischer NaCl gewaschen. Zur Hämolyse der Erythrocyten wurde das gewaschene Sediment in folgende Pufferlösung gebracht (meist 10 ml):

EdTA 2 mM (im Verhältnis 1)

Glycyl-glycin-Puffer; 0,1 M; pH 8,0; Enthaltend

6 mM MgCl₂ (im Verhältnis 2)

und zur Vermeidung einer in vitro-PRPP-Synthese bei der Bestimmung der intracellulären PRPP-Konzentration:

45 mM DPG/ml Puffer (im Verhältnis 3)

Wiederum bei 4° C erfolgte mit Hilfe eines Ultra-Turrax die mechanische Hämolyse. Die hämolysierten Erythrocyten kamen 30 Minuten lang bei 37° C in Warburg-Gefäßen zur Inkubation; das Inkubationsgemisch setzte sich wie folgt zusammen:

1,0 bzw. 2,0 ml Hämolysat

+ 0,1 ml Enzym OPRT-ase + ODC-ase (20 mg/ml Puffer)

+ 0,1 ml 7-¹⁴C-Orotsäure (1 uC; 0,1 mM)

Die Reaktion wurde mit HClO₄ (1 ml; 1,5 M) gestoppt. Das dabei entstehende, aus dem Inkubationsmedium durch Ansäuern ausgetriebene CO₂ wurde in 0,4 ml 4 M KOH absorbiert, diese in Aquasol gebracht und mit Hilfe eines Tri Carb liquid Szintillationszählers die entstehende Radioaktivität (counts/min) gemessen.

2. Messung der PRPP"generation"

Diese Methode entspricht der der Bestimmung der intrazellulären PRPP-Konzentration; die in vitro-PRPP-Synthese des Erythrocytenhämolysats ist jedoch während der 30-minütigen Inkubation nicht durch Zugabe von DPG gehemmt.

3. Optimale Testbedingungen

Während sich bei der Reaktion (1) ein Gleichgewicht einstellt,

$$K = \frac{(\text{Orotsäure}) (\text{PRPP})}{(\text{O-5'-MP}) (\text{PP})} = 8,35$$

ist die Reaktion (2) irreversibel. So kann eine komplette Umwandlung erreicht und angenommen werden.

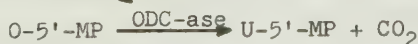
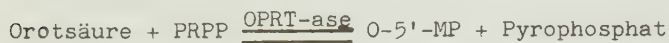
1. pH-Optimum: wurde mit 8,0 als bestmögliches gefunden.

2. Puffer: Glycyl-glycin-Puffer scheint besser geeignet als Triäthanolamin- oder Tris-Puffer.

3. Magnesium: 2×10^{-3} M Mg^{++} sind für eine optimale Aktivität der OPRT-ase notwendig; wir verwendeten in unserem Test 6×10^{-3} M MgCl_2 .

4. Enzyme und Enzymkonzentration

Zur Katalyse der beiden Reaktionen



ist ein Überschuß an ORPT-ase und ODC-ase erforderlich. In unseren hierzu durchgeführten Untersuchungen zeigte sich, daß bei einer Enzymkonzentration von 2 mg Enzymprotein pro Testansatz beide Enzyme im nötigen Überschuß vorlagen; die Linearität der Reaktion war bis über 150 nMol PRPP innerhalb von 45 - 60 Minuten vorhanden. Die Reaktion ist hochspezifisch, denn nur 5-Fluoro-orotsäure scheint auf den Reaktionsablauf einen Einfluß zu haben.

Die Enzyme (Mischung aus beiden) wurden bei -20°C gelagert; sie zeigten während einer Aufbewahrungszeit von ca. 3 - 4 Monaten keinen signifikanten Aktivitätsverlust.

5. Spezifität

OPRT-ase ist spezifisch für Orotsäure und 5-Fluor-orotsäure. Adenin, Uracil, 5-Fluor-uracil, DL-ureido-succinat, L-dihydro-orotsäure, Orotidine sowie 5-bromo-, 5-amino-, 5-nitro-, und 5-methyl-Derivate von Orotsäure reagieren nicht (6).

PRPP ist absolut spezifisch in der Reaktion (1).

6. Genauigkeit der Methode

Der PRPP-Gehalt und die PRPP"generation" wurden jeweils im Triplikat bestimmt. Die Einzelwerte der Bestimmungen ergaben untereinander Abweichungen um etwa $\pm 4-5\%$

7. PRPP-Gehalt der Erythrocyten von gesunden Personen

An zwölf gesunden Versuchspersonen wurde nach 12-stündigem Fasten morgens zwischen 8 und 9 Uhr der Gehalt an PRPP in den Erythrocyten gemessen. Die Werte lagen zwischen 2,5 - 4,5 nMol PRPP/ml gewaschene Erythrocyten.

V. Diskussion

Vergleich mit anderen Methoden zur Bestimmung von PRPP und PRPP"generation"

1. Enzyme und Enzymkonzentrationen

Nach unserer Methode, bei der wir die gereinigten Enzyme OPRT-ase und ODC-ase im Überschuß einsetzen, ist die Menge des $^{14}\text{Co}_2$, das aus 7- ^{14}C -Orotsäure entsteht, ein exaktes Maß für die im Inkubationsmedium vorhandene PRPP-Konzentration. Bei der Methode, die Sperling et al (11) angeben, wird die Reaktion zwischen der Purinbase und PRPP durch die an Aktivkohle absorbierten Phosphoribosyltransferasen katalysiert. Einflüsse bzw. Änderungen dieser Enzymkonzentrationen wirken sich somit auch auf die PRPP-Bestimmung aus.

2. Hämolyse und Deproteinisierung

PRPP ist eine instabile, stark thermolabile Verbindung. So nahm z. B. die PRPP-Konzentration einer Lösung (5 nMol PRPP/ml) innerhalb von sechs Stunden um etwa 20 - 30% ab, was wir durch Bestimmung mit unserem Test feststellten.

Normalerweise werden die gewaschenen Erythrocyten durch Zufügen des dreifachen Volumens 1mM EdTA-Lösung hämolyisiert (7,9). Unsere Beobachtungen zeigten jedoch bei verschiedenen Kontrollausstrichen unter dem Mikroskop nicht in allen Fällen eine komplette Hämolyse.

Bei den bisher angegebenen Methoden zur intrazellulären PRPP-Bestimmung (7,8) erfolgt die Lysierung der Erythrocyten mit Hilfe von EdTA und die anschließende Deproteinisierung des Hämolysates durch Erhitzen im Wasserbad bei ca. 90° C. Die endogenen Nukleotide werden teilweise vorher eliminiert (9), indem das Hämolyat mit Aktivkohle (10 mg/ml) zehn Minuten lang gerührt und anschließend das Erythrocytenstroma und die Aktivkohle durch Zentrifugieren entfernt werden. Allein während dieser Prozedur ergaben sich in unseren Untersuchungen wechselnd hohe Verluste von PRPP zwischen 30 - 50%. Hershko et al. (7) verwendeten EdTA zur Verhinderung der Hydrolyse von PRPP während des Erhitzens (das der Enteiweißung dient). Unsere Vorversuche zeigten hier ebenfalls, daß auch bei genauester Einhaltung der Erhitzungsbedingungen (Zeit und Temperatur) PRPP-Verluste in wechselnder Höhe auftraten.

Aus all diesen Gründen wurden die gewaschenen Erythrocyten in unseren Testreihen bei 4° C mechanisch mit dem Ultra-Turrax hämolyisiert. Die Elimination der endogenen Nukleotide nahmen wir nicht vor, da in vergleichenden Kontrolluntersuchungen mit einem Ultrafiltrat des Hämolysates unter unseren Testbedingungen kein wesentlicher Einfluß auf das Meßergebnis durch die Nukleotide festgestellt werden konnte.

3. Hemmung der PRPP-Synthetase im Hämolysat

Da unserer Ansicht nach das PRPP für eine Enteiweißung durch Erhitzen zu empfindlich war, mußte ein anderer Weg gefunden werden, um die in vitro während der PRPP-Bestimmung durch die PRPP-Synthetase im Hämolysat ablaufende PRPP-Synthese zu vermeiden. Den Untersuchungen von Sperling et al. (10) und Hershko et al. (9) zufolge, schien 2,3-diphospho-glycerat zur Hemmung der in hoher Aktivität in den Erythrocyten vorliegenden PRPP-Synthetase geeignet. 2,3-DPG hemmt bereits in dem physiologischerweise in den Erythrocyten vorkommenden Bereich signifikant die PRPP-Synthetase (9). Wie Abb. 2 zeigt, wird in Anwesenheit von DPG die Wirkung der PRPP-Synthetase während der Inkubation verhindert, d.h. bei DPG-Konzentrationen zwischen ca. 35 - 90 mMol ist die Synthetase vollkommen ausgeschaltet.

4. Meßbereich für die PRPP-Bestimmung

Der PRPP-Gehalt errechnete sich nach Eichkurven, die parallel zu den Versuchsreihen liefen. Abb. 3a und 3b verdeutlichen die Linearität bei der PRPP-Bestimmung unter unseren Testbedingungen in einem Bereich zwischen 0,5 bis etwa 100 nMol PRPP.

Die Reaktionszeit war für PRPP-Konzentrationen von 2,5 bis 10 nMol PRPP pro Ansatz bis zu 45 - 60 Minuten gleichbleibend. Die Wiederfindung von PRPP, das zum Hämolysat dazugegeben wurde, lag bei 95 - 105%.

5. Bezugsgröße für die PRPP-Konzentration

Da die PRPP-Gehalte der Erythrocyten im Verlaufe von kontinuierlichen intravenösen Infusionen (z.B. Xylit oder Fruktose) gemessen werden sollten, mußte eine Bezugsgröße gewählt werden, die unabhängig vom Volumen des Einzelerythrocyten, d.h. von ml Ery/Testansatz und unabhängig von unterschiedlicher Sedimentation ist. Dazu wurden die Hämoglobinkonzentrationen im Versuchsansatz gemessen und damit die Volumina der eingesetzten

ml Erythrocyten entsprechend korrigiert. Auf diese Weise konnte man Veränderungen des PRPP-Gehaltes durch Volumenänderungen des Einzelerythrocyten im Verlaufe und infolge von Dauerinfusionen ausschließen.

6. Untersuchungen zur Verwendung von 6-¹⁴C-Orotsäure

Die bisherigen Verfahren (4,11) zur Bestimmung von PRPP in Erythrocyten sahen eine Inkubation des Hämolysates mit 8-¹⁴C-Hypoxanthin vor und zur enzymatischen Umwandlung entweder die intraerythrocytäre HGPRT-ase oder eine teilweise gereinigte HGPRT-ase aus menschlichen Erythrocyten. Das dabei entstehende Reaktionsprodukt ¹⁴C-IMP wurde nach dem Stoppen entweder mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie oder durch Hochspannungselektrophorese isoliert.

Aus diesem Grunde versuchten wir, in der enzymatischen Reaktion 6-¹⁴C-Orotsäure einzusetzen. Das durch die Reaktion (s.d.) erhaltene ¹⁴C-UMP sollte dabei dünn-schichtchromatographisch isoliert werden. Trotz aller Bemühungen gelang es uns jedoch mit keinem der sonst üblichen Laufmittel 6-¹⁴C-Orotsäure von UMP vollkommen und eindeutig zu trennen.

7. Verwendung von 7-¹⁴C-(Carboxyl-markierter) Orotsäure

Für Orotsäure ist die hier verwendete enzymatische Reaktion mit OPRT-ase spezifisch. Darüberhinaus erlaubt die Menge des aus 7-¹⁴C-Orotsäure entstehenden ¹⁴CO₂ (bei Überschuß an OPRT-ase und ODC-ase) Rückschlüsse auf den PRPP-Gehalt im Inkubationsmedium. Quantitative Absorption des während einer bestimmten Zeitspanne entstehenden ¹⁴CO₂ und Linearität der Reaktion sind weitere Voraussetzungen bei der Entwicklung eines Tests zur PRPP-Bestimmung auf der Grundlage des beschriebenen enzymatischen Systems.

Unsere Experimente hierzu ergaben, daß nach Stoppen der Reaktion mit 1 ml 1,5 M HClO₄, und damit Austreibung des im Inkubationsmedium gelösten ¹⁴CO₂, im dicht ver-

geschlossenen Warburg-Gefäß eine vollständige Absorption des $^{14}\text{CO}_2$ in 0,4 ml 4 M KOH erfolgt. Bei Verwendung dieses Prinzips ist eine Isolierung der entstehenden Nukleotide nicht nötig, der Arbeitsaufwand damit wesentlich geringer, die Genauigkeit der Methode um vieles höher, da Verluste bei der Isolierung der Endprodukte nicht auftreten.

8. Technik der Absorption und der Zählung der Radioaktivität

Die Versuche wurden in konventionellen Warburg-Gefäßen durchgeführt. Das während des Reaktionsablaufes freigesetzte $^{14}\text{CO}_2$ absorbiert sich an die im mittleren Abteil befindliche KOH (0,4 ml; 4 M). Zum Stoppen der Reaktion wurde 1 ml 1,5 M HClO_4 aus dem Seitenarm des Warburg-Gefäßes in den Inkubationsraum gekippt. Um eine möglichst vollständige Absorption des entstandenen $^{14}\text{CO}_2$ zu gewährleisten, wurden die fest verschlossenen Gefäße noch eine Stunde stehen gelassen. Danach wurden die 0,4 ml KOH (das $^{14}\text{CO}_2$ enthaltend) in ein Zählgläschen pipettiert, die mittleren Gefäße der Warburg-Behälter zweimal mit je 0,5 ml aqua dest. nachgespült und dieses ebenfalls in das Zählglas pipettiert. Nach Zugabe von 13,5 ml Aquasol erfolgte im Tri Carb Szintillationszähler die Zählung der Radioaktivität. Den PRPP-Gehalt konnte man nun nach Abzug des Leerwertes an der Eichkurve ablesen und entsprechend auf das eingesetzte, durch Hämoglobinbestimmung korrigierte, Volumen umrechnen.

VI. Zusammenfassende Diskussion

Die Vorteile dieser Methode zur PRPP-Bestimmung in den Erythrocyten und zur Messung der in vitro-PRPP"generation" sind ihre Einfachheit, hohe Spezifität und große Genauigkeit.

Erhitzung des Hämolysates zur Ausschaltung PRPP-synthetisierender und -verbrauchender Reaktionen ist mit großen

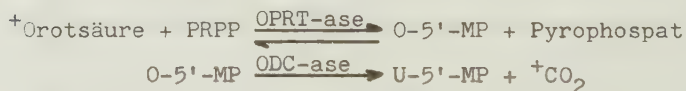
Nachteilen verbunden. Das PRPP ist äußerst thermolabil; sogar bei Raumtemperatur kommt es innerhalb von einigen Stunden zu einem erheblichen Zerfall dieser Substanz, d.h. also zu einem Verlust des in der enzymatischen Reaktion aktiven Produktes. Deshalb erfolgte, um die erhebliche in vitro-PRPP-Synthese im Hämolysat während der Testzeit mit Hilfe einer Hitzeinaktivierung der PRPP-Synthetase zu vermeiden, die Ausschaltung der PRPP-Synthese durch hohe Konzentrationen von 2,3-DPG in Ablehnung an die Methode von Sperling et al. (10). Die PRPP-verbrauchenden Reaktionen hatten unter unseren Testbedingungen keinen wesentlichen Einfluß auf die Bestimmung des intraerythrocytären PRPP-Gehaltes wie Untersuchungen am ultrafiltriertem Hämolysat bewiesen. Als katalysierende Enzyme verwendeten wir erstmals das für die Reaktion mit Orotsäure äußerst spezifische, gereinigte Enzymgemisch aus OPRT-ase und ODC-ase aus Bierhefe.

Bei den bisherigen Methoden zur Bestimmung des PRPP-Gehaltes in Erythrocyten mußten die anfallenden Endprodukte nach Extraktion entweder mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie oder der Hochspannungselektrophorese abgetrennt werden. Mit der hier ausgearbeiteten Methode gelingt es jedoch sehr rasch und einfach, lediglich durch Absorption des während der Inkubationszeit 7-¹⁴C-Orotsäure entstehenden ¹⁴CO₂ an KOH, den im Inkubationsmedium vorhandenen PRPP-Gehalt mit Hilfe einer Eichkurve zu berechnen. Allein durch die komplette Isolierung des ¹⁴CO₂ erreichen wir größere Genauigkeit und Schnelligkeit bei der Bestimmung als es mit den bisher üblichen Verfahren möglich war; die Gewinnung der dortigen Endprodukte (IMP und UMP) ist dagegen viel anfälliger für Verluste während der Isolierung. Die PRPP"generation" im Hämolysat, d.h. die Fähigkeit zur PRPP-Synthese in den Erythrocyten in vitro unter den Bedingungen, wie sie im roten Blutkörperchen zur Zeit der Blutentnahme vorherrschen, wurde auf die gleiche Weise bestimmt; nur die Hemmung der PRPP-Synthese durch 2,3-DPG fand dabei nicht

statt. Die PRPP-Synthese ist unter diesen Voraussetzungen dann abhängig von den in vivo vorhandenen Konzentrationen an Effektoren und Inhibitoren der Synthese, d.h. im wesentlichen von anorganischem Phosphat, Ribose-5-phosphat und Nukleotiden (z.B. AMP, ADP).

VII. Zusammenfassung

Es erfolgte die Ausarbeitung einer einfachen Methode zur Bestimmung des intraerythrocytären PRPP-Gehaltes sowie der in vitro-PRPP"generation" im Hämolysat von Erythrocyten. Das Verfahren ist im Bereich von 1 - 100 nMol PRPP sehr exakt mit Abweichungen von nur etwa $\pm 4-5\%$. Die rasche und vor allem komplette Hämolyse der Erythrocyten wird durch mechanische Desintegration erreicht. Das bisher übliche Erhitzen und die damit verbundene variable, nicht im Voraus zu berechnende Zerstörung des thermolabilen PRPP kann so vermieden werden. Die PRPP-Synthese im Hämolysat während des Untersuchungsganges verhindert man durch Zufügen hoher 2,3-DPG-Konzentrationen zum Inkubationsmedium. Als Prinzip zur Messung des PRPP-Gehaltes und der in vitro-PRPP"generation" kommt folgende Reaktion zur Anwendung:



Als Enzyme kommen dabei gereinigte OPRT-ase und ODC-ase aus Bierhefe zur Verwendung. Das bei dieser Reaktion aus 7- ^{14}C -Orotsäure entstehende $^{14}\text{CO}_2$ wird in KOH absorbiert und kann - als Maß für den PRPP-Gehalt - sofort nach der Inkubation im Tri Carb Szintillationszähler gemessen werden. Die in vitro-PRPP"generation" im Hämolysat wird auf die gleiche Weise bestimmt; die PRPP-Synthetase ist dabei jedoch nicht durch 2,3-DPG gehemmt.

Die Normalwerte für die intraerythrocytäre PRPP-Konzentration liegen nach dieser Methode zwischen 2,5 - 4,5 nMol PRPP/ml gewaschene Erythrocyten.

VIII. Literaturübersicht

1. Fox, I.H., and Kelley, W.N.
Annals of Internal Medicine 74, 424-433 (1971)
2. Kelley, W.N., Fox, I.H., Wyngaarden, I.B.
Clin. Res. 18, 457 (1970)
3. Kelley, W.N., Fox, I.H., Wyngaarden, I.B.
Biochem. Biophys. Acta 215, 512 (1970)
4. Fox, I.H., Wyngaarden, I.B., Kelley, W.N.
New Engl. J. Med. 283, 1172 (1970)
5. Lieberman, I., Kornberg, A., and Simms, E.S.
J. Biol. Chem. 215, 389 (1955)
6. Flaks, I.G., in "Methods in Enzymology" (S.P. Colowick
u. N.O. Kaplan, Editors), Vol. 6, p. 148
Acad. Press, New York u. London (1963)
7. Hershko, A., Hershko, C., and Mager, I.
Isreel J. Med. Sci. 4, 939 (1968)
8. Sperling, O., Ophir, R., and de Vries, A.
Europ. J. Clin. Biol. Res. 16, 147 (1971)
9. Hershko, A., Razin, A., and Mager, I.
Biochem. Biophys. Acta 184, 64 (1969)
10. Sperling, O., Eilam, G., Persky-Brosh, S., and de Vries, A.
I. Lab. Clin. Med. 79, 1021 (1972)
11. Sperling, O., Eilam, G., Persky-Brosh, S., and de Vries, A.
A. Biochem. Med. 6, 310 (1972)
12. Hershko, A., Razin, T., Shoshani, T., and Mager, I.
Biochem. Biophys. Acta 59, 149 (1967)
13. Atkinson, D.E., and Fall, L.
J. Biol. Chem. 242, 3241 (1967)
14. Switzer, R.L.
J. Biol. Chem. 243, 2854 (1968)
15. Krenitsky, Thomas A., and Rhoda Papaioannou
J. Biol. Chem. 244, 1271 (1969)
16. Krenitsky, T.A., Rhoda Papaioannou, and Gertrude B.
Ellon, J. Biol. Chem. 244, 1263 (1969)
17. Agarwell, R.P., and R.E. Parks, Jr.
J. Biol. Chem. 244, 644 (1969)

18. Gadd, R.E.A., and J.F. Henderson
J.Biol.Chem. 245, 2979 (1970)
19. Henderson, Ellen J., H.Nagano, H.Zalkin, and Lian Hua Hwang,
J.Biol.Chem. 245 1416 (1970)
20. Henderson, Ellen J., H.Zalkin, and Lian Hua Hwang
J.Biol.Chem. 245, 1424 (1970)
21. Arnold, William J., and William N. Kelley
J.Biol.Chem. 248, 7398 (1973)
22. Kelley, William N., and Jean C.Meade
J.Biol.Chem. 246, 2953 (1971)
23. Fox, Irving H., and William N.Kelley
J.Biol.Chem. 246, 5739 (1971)
24. Kim, Bunug Kyn, Sungman Cha, and R.E.Parks, Jr.
J.Biol.Chem. 243, 1763 (1968)
25. Kim, Bunug Kyn, Sungman Cha, and R.E.Parks, Jr.
J.Biol.Chem. 243, 1794 (1968)
26. Henderson, J.Frank, L.W.Brox, W.N.Kelley, Fred M. Rosen-
bloom, and J.Edwin Seegmiller
J.Biol.Chem. 243, 2514 (1968)
27. Rowe, Peter B., and James B.Wyngaarden
J.Biol.Chem. 243, 6373 (1968)
28. Lieberman, Irving, A.I.Lansing, and William E.Lynch
J.Biol.Chem. 242 736 (1967)
29. Atkinson, Daniel E., and G.M.Walton
J.Biol.Chem. 242, 3239 (1967)
30. Aleman, Victor, and Philip Handler
J.Biol.Chem. 242, 4087 (1967)
31. Chance, Britton, and Jane Harting Park
J.Biol.Chem. 242, 5093 (1967)
32. Voll, Mary Jane, Ettore Appella, and R.G.Martin
J.Biol.Chem. 242, 1760 (1967)
33. Fox, R.M., O'Sullivan, W.J., Firkin, B.J.
Amer.I.Med. 47, 332-6 (1969)
34. Rapid Column Chromatogr. Measurement of Orotic Acid
Clinical Chemistry Vol.17, Nr.11 (1971)

IX. Abbildungen

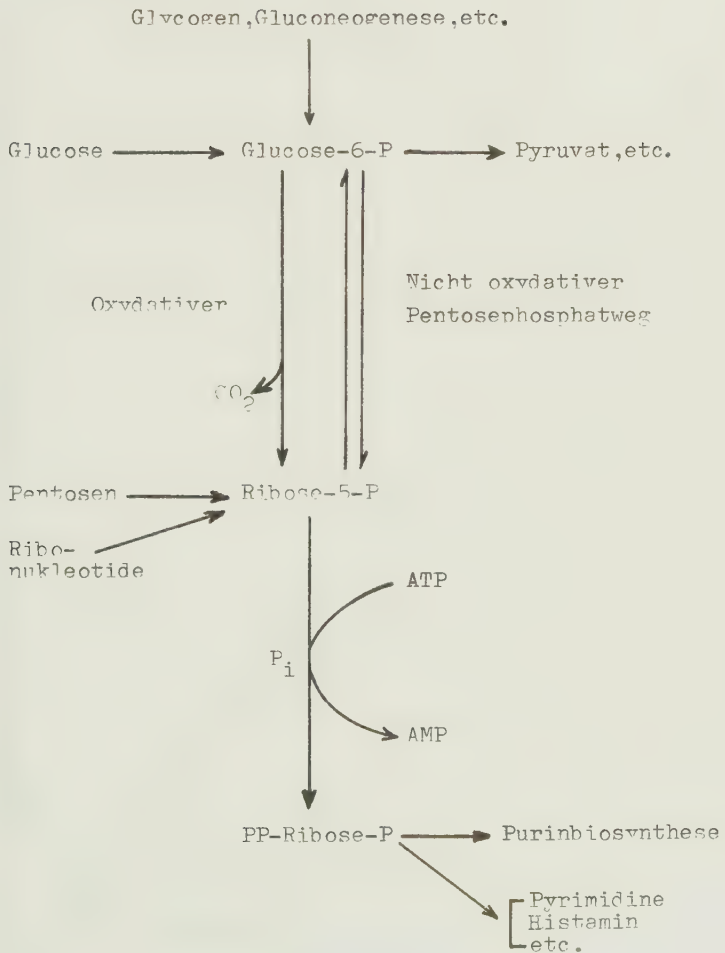


Abb. 1

nMol PRPP/0,5 μ l Ery

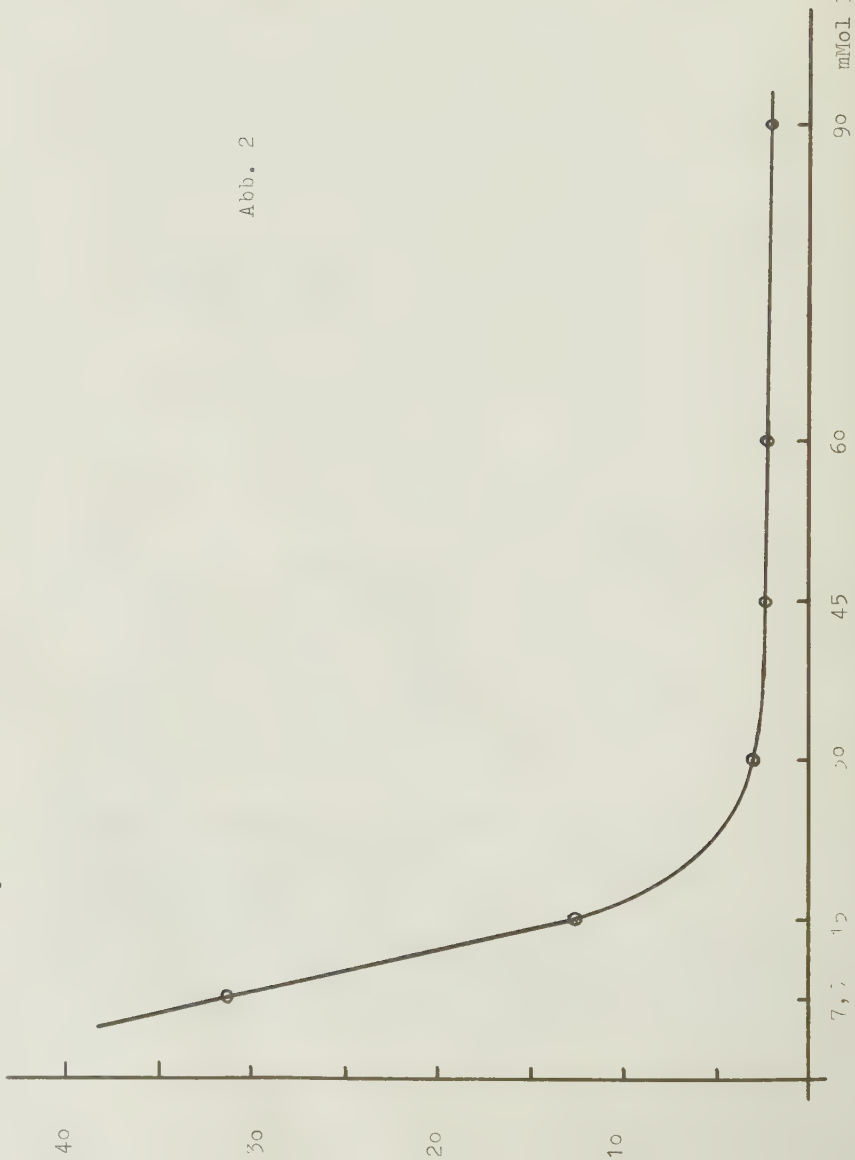


Abb. 2

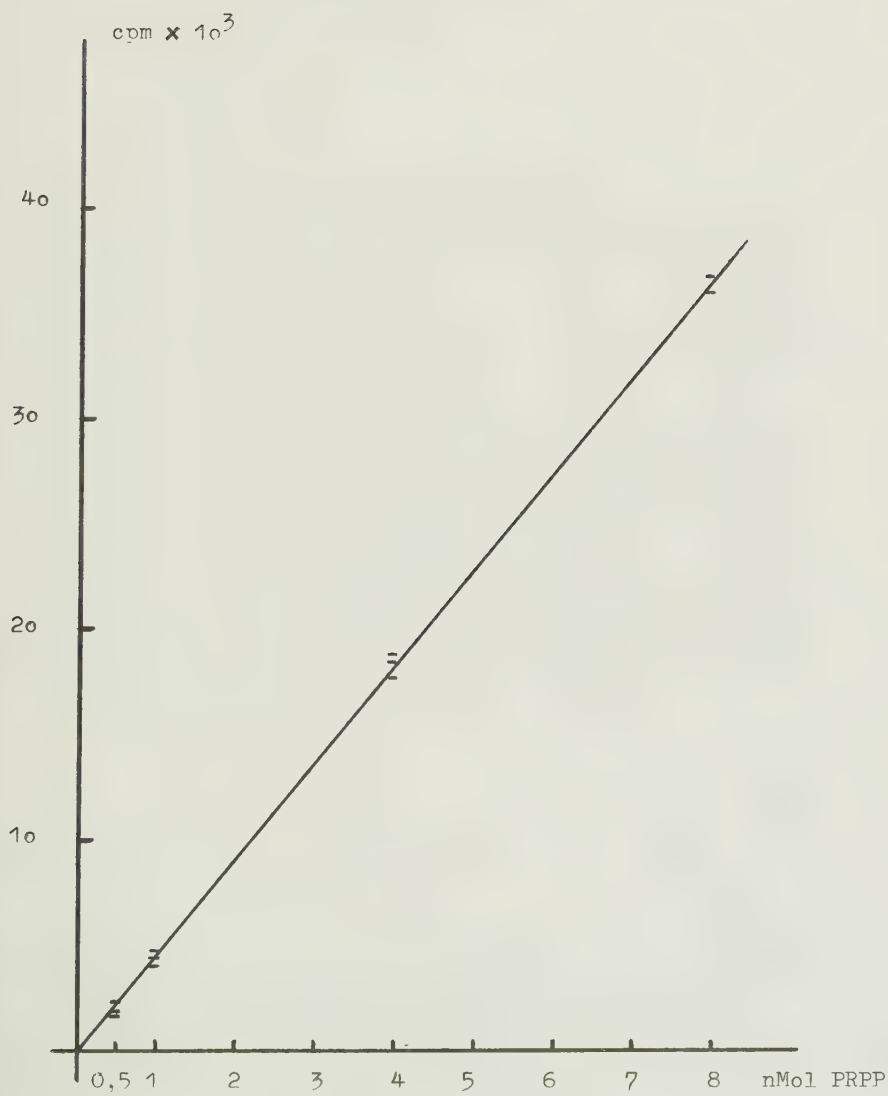


Abb. 3a

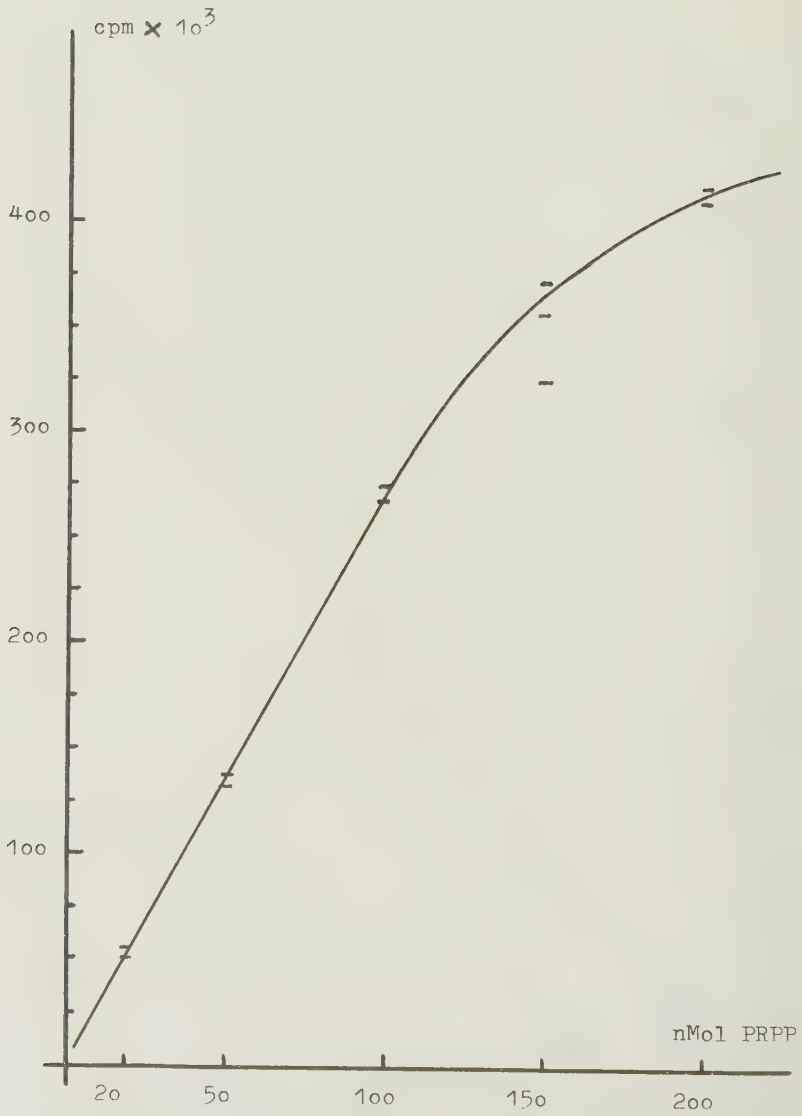


Abb. 3b

L e b e n s l a u f

Am 8. November 1946 wurde ich als ältester Sohn des Arztes Dr. med. Josef Thiel und dessen Ehefrau Elfriede, geb. Hildebrand, in Freital bei Dresden geboren. Meine Eltern sind Heimatvertriebene aus Schlesien. 1953 - 1960 besuchte ich die Grundschule in meinem Heimatort Wilsdruff/Kreis Freital, wo mein Vater eine Praxis hatte und das Krankenhaus führte. Im August 1960 mußten wir aus der DDR wegen politischer Gründe fliehen. Im September 1960 trat ich in die 3. Klasse des mathematisch-naturwissenschaftlichen Gymnasiums in Fürstenfeldbruck ein und absolvierte 1967 dort das Abitur. Danach begann ich das Medizinstudium an der Universität München, legte 1969 die naturwissenschaftliche und 1971 die ärztliche Vorprüfung ab. Meine Doktorarbeit erarbeitete ich in den Jahren 1972 und 1973 in der Universitätsklinik München. 1974 Meldung zur ärztlichen Prüfung, die ich am 20. Juni 1974 in München ablegte.

